

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd**

**Laboratorní příručka a standardní operační postupy pro
hematologický úsek OKBH, Panochova nemocnice
s.r.o. Turnov**

(bakalářská práce)

Hradec Králové, 2011

Kateřina Knoppová

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práci jsem nepoužila k získání jiného titulu.“

datum

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala především primáři RNDr. Petru Brzákovi za umožnění vypracování této bakalářské práce pod jeho vedením, dále za jeho cenné rady, ochotu a výbornou spolupráci v průběhu celého roku.

Mé poděkování také patří paní Janě Sedlákové za seznámení práce s programem SLP a samozřejmě také vedoucí laborantce paní Zdeňce Drobníkové a celému kolektivu z Oddělení Klinické Biochemie a Hematologie, Panochovy nemocnice s.r.o. Turnov, za jejich pomoc a trpělivost.

Děkuji také PharmDr. Petru Jílkovi CSc. za důležité rady a připomínky.

OBSAH

1	ABSTRAKT.....	5
2	ABSTRACT	6
3	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	7
4	ÚVOD	8
5	ZKRATKY	9
6	TEORETICKÁ ČÁST	10
6.1	Charakteristika laboratoře	10
6.2	Přístrojové vybavení.....	10
6.3	Akreditace a certifikace	10
6.3.1	Validace a verifikace.....	11
6.3.2	Standardizace práce v hematologické laboratoři	11
6.3.3	Kontrola kvality	12
6.4	Vyšetření prováděná na koagulometru Sysmex CA 500.....	13
6.4.1	Aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT)	13
6.4.2	SOP (standardní operační postup) pro APTT	14
6.4.3	Protrombinový test (PT).....	16
6.4.4	SOP (standardní operační postup) pro PT	16
6.4.5	Stanovení fibrinogenu.....	19
6.4.6	Stanovení Antitrombinu III	19
6.5	Vyšetření prováděná na analyzátoru Beckman Coulter HMX	20
6.5.1	Vyšetření krevního obrazu.....	20
6.5.2	Diferenciální rozpočet leukocytů.....	22
6.5.3	Stanovení retikulocytů	23
6.6	Vyšetření prováděná na analyzátoru Abbott Axsym	24
6.6.1	Stanovení D- dimerů.....	24
7	PRAKTICKÁ ČÁST	25
7.1	Postup pro verifikaci metody a vypracování verifikačního protokolu ...	25
7.2	Verifikační protokol ze dne 10.12.2010 – Hemoglobin.....	26
7.3	Verifikační protokol ze dne 15.11.2010 – Protrombinový test	28
8	DISKUSE.....	30
9	ZÁVĚR.....	31
10	LITERATURA	32

1 ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena především na verifikaci metod a standardní operační postupy, které jsou vyžadovány v rámci podmínek akreditace. Hlavním cílem této bakalářské práce byla pomoc při přípravě laboratorní příručky a příprava řízené dokumentace, především vypracování standardních operačních postupů a verifikace metod pro hematologický úsek. Bakalářská práce je rozdělena na část teoretickou a praktickou. V teoretické části je představena laboratoř a také proces akreditace, na kterou se Oddělení Klinické Biochemie a Hematologie (OKBH) Panochovy nemocnice s.r.o. Turnov připravuje.

Dále jsou představeny jednotlivé analyzátory z hematologického úseku laboratoře a nejfrekventovanější vyšetření, která se zde provádějí. K těmto metodám jsme vypracovali standardní operační postupy, provedli jsme jejich verifikaci a následně jsme vypracovali verifikační protokoly.

Pro velké množství materiálů jsou uvedeny dva standardní operační postupy a dva verifikační protokoly.

2 ABSTRACT

This bachelor's thesis is focused mainly on the verification of methods and on the standardized operating procedures, which are required in the conditions of accreditation. The main purpose of this thesis was a contribution to the elaboration of the laboratory manual and the preparation of the directed documentation, mainly the elaboration of the standardized operating procedures and the verification of methods for the hematological department.

The thesis is divided into the theoretical and the practical part. The theoretical part presents the laboratory and the accreditation process which the Department of the Clinical Biochemistry and Hematology is preparing for. Furthermore, it describes various analyzers from the hematological section of the laboratory and the most frequently executed methods. We created the standardized operating procedures for these methods, verified them and created the verification protocols.

Due to the huge amount of the documents we present here two standardized operating procedures and two verification protocols.

3 ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této práce je příprava laboratorní příručky a řízené dokumentace pro hematologický úsek OKBH Panochovy nemocnice s.r.o. Turnov. Laboratoř se připravuje na audit v rámci akreditace, a proto je potřebné provést validaci nejfrekventovanějších metod. Hlavním účelem této práce je tedy verifikace metod a vypracování verifikačních protokolů. Jednou z důležitých částí řízené dokumentace jsou mimo jiné standardní operační postupy, které jsou v práci také uvedeny.

4 ÚVOD

Hlavním úkolem této bakalářské práce je příprava OKBH Panochovy nemocnice s.r.o. Turnov na budoucí audit, který se koná z důvodu potřebné akreditace pro laboratoř.

Pro splnění požadavků akreditace je mimo jiné nutné vypracování laboratorní příručky a standardních operačních postupů, na jejichž přípravě jsme po celý rok pracovali. Tato práce je ale zaměřena především na standardní operační postupy a vypracování verifikačních protokolů v rámci validace u nejfrekventovanějších metod pro hematologický úsek laboratoře. Zpracování všech potřebných dokumentů probíhá ve speciálním programu SLP (Správná laboratorní práce). Z důvodu velkého množství materiálů je uvedena pouze část dokumentů.

5 ZKRATKY

APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
AT III	antitrombin III
b	bias
B_{biol}	bias odvozený z biologických variabilit
ČIA	Český institut pro akreditaci
CV	variační koeficient
CV _i	intraindividuální biologická variabilita
CV _g	interindividuální biologická variabilita
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace
DIFF	diferenciální rozpočet
I_{biol}	přesnost odvozená z biologických variabilit
INR	International Normalised Ratio-mezinárodní normalizovaný poměr
ISI	International Sensitivity Index- mezinárodní index citlivosti
KO	krevní obraz
MEIA	enzymová imunoanalýza na mikročasticích
NASKL	Národní akreditační středisko pro klinické laboratoře
OKBH	Oddělení Klinické Biochemie a Hematologie
PT	protrombinový test
R(x)	výtěžnost
SD	směrodatná odchylka
SLP	správná laboratorní práce
SOP	standardní operační postup
TE_{biol}	celková chyba odvozená z biologických variabilit
$U_{\text{r,tot}}$	kombinovaná nejistota

6 TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Charakteristika laboratoře

Oddělení Klinické Biochemie a Hematologie je součástí Panochovy nemocnice s.r.o., Turnov. Nachází se zde úsek biochemie, močových analýz, hematologie a transfuzní úsek. Součástí OKBH je dále krevní sklad a místnost pro odběry krve a autotransfuze.

Laboratoř provádí základní a specializovaná biochemická vyšetření, základní a specializovaná hematologická vyšetření, odběr biologického materiálu a konzultační činnost. Dále se zde provádí také základní imunohematologické vyšetření, distribuce transfuzních přípravků a výroba autotransfuzí.

6.2 Přístrojové vybavení

Pro biochemická vyšetření laboratoř využívá analyzátor firmy Beckman Coulter UniCel Dx C 880i a UniCel Dx I 800. Další analyzátor, který je umístěn v biochemické části laboratoře je Architect i1000_{SR}, na kterém se provádí imunochemická vyšetření. Např.: Toxo IgG, toxo IgM, HIV.

Na úseku hematologie se nachází hematologický analyzátor Beckman Coulter HmX, koagulometr Sysmex CA 500 a analyzátor firmy Abbott AxSYM, na kterém se stanovují d-dimery. Laboratoř dále vlastní celkem 4 centrifugy firmy Heaerus.

6.3 Akreditace a certifikace

Akreditace je úředně uznaná způsobilost laboratoře k vykonávání určité činnosti, o kterou si laboratoř může zažádat u akreditačního orgánu.

Pro Českou republiku je akreditačním orgánem Český institut pro akreditaci (ČIA). Cílem tzv. Národního akreditačního střediska pro klinické laboratoře (NASKL) je připravit klinické laboratoře k budoucí akreditaci. NASKL je řízený radou pro akreditaci klinických laboratoří. Akreditační proces začíná po podání žádosti. Během tohoto procesu je potřebné vytvořit dokumentaci pro laboratoř, která zahrnuje např.: laboratorní příručku, standardní operační postupy, směrnice a řady atd. Je nezbytné tuto dokumentaci udržovat ve stále aktuálním stavu.

„Laboratorní příručka reprezentuje laboratoř, přináší základní informace o jejích nabídkách, podmínkách a o nabízené paletě laboratorních testů.“ (web5)

Akreditační orgán provádí v průběhu tohoto procesu tzv. auditu. Prostřednictvím auditu je laboratoř sledována a posuzována. Tyto audity se poté konají i po získání akreditačního uznání. Jedná se o tzv. reakreditaci. Celý proces je tedy velmi účinným nástrojem udržování a stálého zlepšování kvality laboratorní činnosti. (Racek, 2006)

6.3.1 Validace a verifikace

„Validace je proces, kterým se získávají objektivní důkazy, že metoda, postup či přístroj vykazují vlastnosti, jež jsou k danému použití požadovány.“ (Racek, 2006)

Tyto důkazy můžeme získat dvojím způsobem. Mohou být získány experimentálně nebo to mohou být externí údaje z dokumentace výrobců, vědeckých prací, odborných publikací či data z certifikátů. Všechny měřicí postupy, které daná laboratoř používá, musí být validované. Různé metody vyžadují různý rozsah validace. Neměl by být neúměrně velký, avšak musí být pro danou metodu dostačující. Pro splnění validace dané metody je nutné vypracovat validační plán, na základě kterého se vypracuje validační protokol, ve kterém nalezneme výsledky a závěry dané validace.

Verifikace pak je důkaz, že laboratoř je schopna provádět validovanou laboratorní metodu řádně a spolehlivě na požadované úrovni. Výsledkem každé provedené verifikace je verifikační protokol. (web1)

6.3.2 Standardizace práce v hematologické laboratoři

„Hlavním záměrem standardizace laboratorních podmínek je zajištění správnosti a přesnosti stanovení a dosažení srovnatelnosti výsledků na lokální, regionální, národní i mezinárodní úrovni.“ (Matýšková, 1999)

Zabezpečení standardizace práce v hematologické laboratoři je poněkud obtížnější než je tomu v jiných laboratořích a to obzvláště jedná-li se o hemokoagulační vyšetření, u kterých vyšetřujeme labilní charakteristiky krve. Vyrobit vhodné standardní vzorky jako kontrolní materiály je tedy dosti obtížné.

Správnost laboratorních výsledků závisí na neanalytických faktorech, analytických a neméně také na postanalytických faktorech. Faktory analytické mohou být ovlivněny samotnou laboratoří, zatímco některá pochybení a chyby v preanalytickém stadiu bývají těžko prokazatelné. (Matýšková, 1999)

6.3.3 Kontrola kvality

Abychom zajistili spolehlivé výsledky měření, je nutné provádět dlouhodobou systematickou kontrolu kvality přímo v hematologické laboratoři. Pravidelná kontrola kvality dodá jistotu o správnosti vydávaných výsledků nejen lékařům, ale i laborantům a také pacientům. Základem je dodržování jednotlivých pravidel vnitřní (interní) kontroly kvality.

Vlastní kontrolu kvality v hematologické laboratoři můžeme rozdělit do tří částí:

- 1) Eliminace neanalytických chyb
- 2) Vnitřní kontrola kvality
- 3) Externí kontrola kvality

Tyto kontrolní procesy samozřejmě spadají do požadavků akreditace. Pro každou laboratoř je proces řízení kvality individuální.

Vnitřní kontrola kvality

Mezinárodně označená – Internal Quality Control. Jedná se o pravidelné monitorování činnosti laboratoře, které je prováděno samotným personálem. Vnitřní kontrola kvality se provádí pomocí měření kontrolních materiálů, které jsou zařazeny do jednotlivých sérií měření. Je třeba provést také kontrolu kalibrace pomocí kalibrátorů.

Externí kontrola kvality

Mezinárodně označená – External Quality Control. Laboratorní výsledky jsou hodnoceny externí nezávislou organizací. Provádí se pravidelným porovnáváním naměřených hodnot kontrolních vzorků, které byly naměřeny více laboratořemi. Pro splnění účelu by měly být kontrolní vzorky zařazeny v rutinním provozu mezi vzorky pacientů. (web2)

6.4 Vyšetření prováděná na koagulometru Sysmex CA 500

Jedná se o koagulometr firmy Sysmex, na kterém se provádějí následující vyšetření: Aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT), Protrombinový test (PT), stanovení fibrinogenu a stanovení Antitrombinu III (AT III). Koagulační vyšetření spočívá v měření reakčního času od spuštění reakce až po vytvoření prvních fibrinových vláken. Tyto naměřené časy se následně porovnávají s časy normální plasmy.

6.4.1 Aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT)

APTT je test k vyšetření koagulace krve. Provádí se z krve odebrané do zkumavky s citrátem sodným, protože k tomuto vyšetření potřebujeme dekalciifikovanou plasmu. APTT monitoruje vnitřní systém koagulace.

V tomto testu se může projevit nedostatek nebo snížená funkční aktivita všech těchto faktorů: II, V, VIII, IX, X, XI, XII, prekalkreinu a vysokomolekulárního kininogenu. Test závisí rovněž na hladině a složení fibrinogenu. K plasmě se přidávají čištěné fosfolipidy, které jsou podobné fosfolipidům krevních destiček, např. kefalín, dále pak kalcium (Ca^{2+}) a povrchový aktivátor na bázi křemičitanů nebo kyseliny elagové k urychlení reakce. Tímto dochází k aktivaci koagulačního systému vnitřní cestou. Výsledky vyjadřujeme v sekundách. Lze také vypočítat poměr R časů testované plazmy a plazmy kontrolní.

$R = t_p/t_N$

Fyziologické hodnoty: $R = 0,8 - 1,2$

t_pplazma pacienta

t_Nkontrolní plasma

Klinické použití: Prodloužený čas APTT může být způsoben např. jaterním onemocněním, při poruchách faktorů vnitřního koagulačního systému, u hemofilí nebo při nedostatku vitamínu K. U trombofilních stavů můžeme nacházet naopak lehce zkrácené časy. (Pecka, 2010)

6.4.2 SOP (standardní operační postup) pro APTT

Abstrakt

Stanovení aktivovaného parciálního tromboplastinového času reagensí Actin FS firmy Dade Behring.

Princip

Aktivace mediátorů vnitřní cesty přeměny protrombinu na trombin, prováděná za přítomnosti čištěných fosfolipidů, kalcia a povrchového aktivátoru. Vzniklý trombin poté aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrin a dále na nerozpustný fibrin.

Místo provádění

Hematologická laboratoř OKBH Panochovy nemocnice Turnov s.r.o.

Odběr primárního vzorku

Odběr se provádí z plné krve do umělohmotné zkumavky (Sarstedt, zelený uzávěr). Tato zkumavka obsahuje citrát sodný 0,106 mol/l jako antikoagulant v poměru 1:10,

tj. 9 objemových dílů krve + 1 objemový díl citrátu sodného o uvedené koncentraci. Odběr provádí odběrová sestra

Manipulace se vzorky

Identifikace vzorku – přiřazení identifikačního čísla laboratoře, sjednocení s žádankou a zápis do laboratorního informačního systému.

Centrifugace: 10 – 15 minut při 3000ot./min. (2500g). Stabilita plasmy po odběru je při 20 °C 4 hodiny, při heparinové terapii jen 2 hodiny. Plasma nesmí být skladována v lednici.

Přístroje

Centrifuga Megafuge 1,0 firma Haereus
automatický koagulometr Sysmex CA 500

Reagencie

Set Actin FS firma Dade Behring (Reagencie je tekutá, připravená k měření)

Reagencie neobsažené v setu: CaCl₂ 0,025 mol/l

Pracovní postup

- 1) identifikace vzorků
- 2) centrifugace
- 3) zkumavku s vyšetřovanou plasmou vložíme do přístroje a metodicky postupujeme podle návodu přístroje

Výpočty

Výpočet poměru R - provádí koagulometr:

$$R_{\text{APTT}} = \frac{\text{Čas pacienta}}{\text{Čas kontroly}}$$

Charakteristika spolehlivosti

Rozsah měření: 20-250 s

Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty:

Neléčení: poměr = 0,8 - 1,2

Léčení heparinem: poměr = 2,0 – 4,0

Řízení kvality

Pro kontrolu správnosti se každý den používá normální a patologická plasma na dvou hladinách.

Kontrolní reagentie:

Bio-Rad, level 1, 2, 3 s atestovanou hodnotou APTT, TT, PT, fibrinogenu a ATIII

Interpretace

Hodnoty vydané koagulometrem jsou ověřeny, individuálně posouzeny, zaevidovány a expedovány z laboratoře.

Poznámky

Pozor na hemolytickou, chylózní a ikterickou plazmu. Lze testovat pouze do určitého stupně zákalu.

6.4.3 Protrombinový test (PT)

Protrombinový test, jinak také nazývaný Quickův test, patří mezi základní koagulační testy. Tento test slouží k vyšetření krevní srážlivosti. Protrombinový čas sleduje funkčnost tzv. vnějšího systému aktivace koagulace. Tímto testem můžeme prokázat nedostatek nebo se může projevit snížená funkční aktivita faktorů II (protrombin), V (proakcelerin,) VII (prokonvertin) a X (Stuarta-Prowerové). Test závisí rovněž na hladině a složení fibrinogenu.

Protrombinový test se provádí přidáním tkáňového faktoru a kalcia k citrátové plazmě. Vzhledem k různé aktivitě používaných tkáňových faktorů, byl vyvinut způsob umožňující srovnání výsledků různých laboratoří. PT je proto většinou vyjadřován v jednotkách INR (international normalised ratio).

Klinické použití: Tato hodnota se vyšetřuje u krvácivých stavů, jako součást předoperačního vyšetření, při podezření na vrozený nebo získaný nedostatek koagulačních faktorů, při onemocnění jaterního parenchymu, u deficiencie vitamínu K a u koagulopatií. (Pecka, 2010, Kopáč, 2004)

6.4.4 SOP (standardní operační postup) pro PT

Abstrakt

Stanovení tromboplastinového času (Quickova času) na koagulometru firmy Sysmex CA 500.

Princip

Sleduje se tzv. vnější cesta aktivace přeměny protrombinu na trombin. Test začíná přidáním tkáňového tromboplastinu, který obsahuje vápenaté ionty (Ca^{2+}) k citrátové plazmě a měří se čas až do vzniku prvních fibrinových vláken.

Místo provádění

Hematologická laboratoř OKBH Panochovy nemocnice Turnov s.r.o.

Odběr primárního vzorku

Odebírá se 4,5 ml nativní krve do zkumavky z umělé hmoty (Sarstedt, zelený uzávěr). Tato zkumavka obsahuje citrát sodný 0,106 mol/l jako antikoagulans v poměru 1:10, tj. 9 objemových dílů krve + 1 objemový díl citrátu sodného o uvedené koncentraci. Odběr provádí odběrová sestra.

Manipulace se vzorky

Identifikace vzorku – přiřazení identifikačního čísla laboratoře, sjednocení s žádankou a zápis do laboratorního informačního systému.

Centrifugace: 10 – 15 minut při 3000ot./min. (2500g).

Přístroje

Centrifuga Megafuge 1,0 firma Haereus
automatický koagulometr Sysmex CA 500

Reagencie

Set Thromborel S, Dade Behring (reagencie je lyofilizovaná, rekonstituce deionizovanou vodou 10 ml, stabilizovat 30 minut při teplotě 37 °C.)

Pracovní postup

- 1) identifikace vzorků
- 2) centrifugace
- 3) zkumavku s vyšetřovanou plasmou vložíme do přístroje a metodicky postupujeme podle návodu přístroje

Výpočty

$$R = tP / tN$$

tP – čas pacienta

tN – čas kontrolní plazmy

$$INR = (t_n/t_k)^{ISI}$$

t_n - čas nemocného

t_k - čas kontrolní plazmy

Protrombinové časy pacienta vydáváme v sekundách.

Hodnota INR se zaokrouhlí na dvě desetinná místa a vypočte se jako poměr protrombinového času pacienta a času normálního vzorku, který je umocněný na hodnotu ISI (International Sensitivity Index). Hodnotu INR používáme u pacientů léčených kumarinovými preparáty.

Charakteristika spolehlivosti

Rozsah měření: 8 -170 s

Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty:

Neléčení: poměr R = 0,8 - 1,2

Léčení heparinem: poměr INR = 2,0 – 4,5

Řízení kvality

Pro kontrolu správnosti se každý den používá normální a patologická plasma na dvou hladinách.

Kontrolní reagentie:

Bio-Rad, level 1, 2, 3 s atestovanou hodnotou APTT, TT, PT, fibrinogenu a ATIII

Interpretace

Hodnoty vydané koagulometrem jsou ověřeny, individuálně posouzeny, zaevidovány a expedovány z laboratoře.

Poznámky

Index citlivosti ISI udává citlivost používaného tromboplastinu. Nejideálnější jsou tromboplastiny, kde ISI = 1.

Tuto hodnotu nalezneme u každé šarže tromboplastinu.

Možné zdroje chyb: nesprávný odběr

chybná centrifugace

nedodržení poměru krve a antikoagulancia

dlouhodobé skladování plasmy při laboratorní teplotě

narušení erytrocyty, které vyvolávají koagulaci

(Pecka, 2010, Kopáč, 2004)

6.4.5 Stanovení fibrinogenu

Stanovení fibrinogenu se řadí mezi testy specifické. Fibrinogen je glykoprotein o MW 340 kD, jehož biologický poločas je 3 – 5 dní. Jeho syntéza probíhá v játrech a je obsažený v plazmě a v granulích krevních destiček. Minimální plazmatická koncentrace fibrinogenu potřebná pro hemostázu se pohybuje mezi 0,5 – 1,0 g/l. Fibrinogen patří mezi proteiny akutní fáze. Jeho hladina se při různém poškození, či zánětu může zvýšit až na 3 – 5 násobek původní hodnoty. (Pecka, 2004)

Klinické použití: Je – li hladina fibrinogenu vyšší než 4 g/l, je zde zvýšené riziko trombózy. To může být způsobeno zvýšenou syntézou, sníženým odbouráváním nebo může být zvýšení způsobeno genetickými vlivy. Vyšší hodnoty nacházíme u zánětlivých onemocnění, u dysfibrinogenemií, při poruše jaterního parenchymu a také v těhotenství. Snížené hodnoty lze nalézt u afibrinogenemií nebo při antikoagulační léčbě. (Kopáč, 2004)

6.4.6 Stanovení Antitrombinu III

Jedná se o fyziologický inhibitor serinových proteáz, jehož biologický poločas je 3 – 4 dny. Inhibuje především trombin, dále pak faktor Xa, IXa, XIa, XIIa, plasmin a kalikrein. Je tvořen v játrech a endoteliích. Antitrombin má účinek antikoagulační, ale i protizánětlivý, který spočívá v ochraně endotelu s postupným uvolněním prostacyklinu. Antitrombin je považován za nejdůležitější antikoagulant. Při jeho deficitu není heparin plně účinný. V opačném případě heparin urychluje inhibici trombinu a tím i koagulaci. (Kopáč, 2004)

Klinické použití: Jak již bylo uvedeno, játra jsou místem syntézy nejen Antitrombinu III, ale i koagulačních faktorů a inhibitorů koagulace. Při poruše funkce jaterního parenchymu tedy nastává nedostatek koagulačních faktorů i přirozených inhibitorů. Nejvíce je postižena syntéza fibrinogenu a protrombinového komplexu. Nacházíme poruchy počtu trombocytů, vitamin K dependentních inhibitorů a antitrombinu. Pokles Antitrombinu III je označován za citlivý indikátor poruchy jaterní funkce.

Nedostatek AT III může být také jako důsledek diseminované intravaskulární koagulace (DIC), jinak také nazývaná konsumpční koagulopatie.

Konsumpce AT III je při DIC zvýšena až 20krát, avšak zdravá játra jsou schopna zvýšit syntézu pouze 6krát. Zaznamenáváme i pokles hladin a aktivity ostatních koagulačních faktorů. (web3)

6.5 Vyšetření prováděná na analyzátoru Beckman Coulter HMX

Beckman Coulter HMX je pětipopulační hematologický analyzátor. Na tomto analyzátoru se provádí vyšetření krevního obrazu, stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů a také se využívá ke stanovování retikulocytů.

Analyzátor nám umožňuje pracovat v tzv. otevřeném nebo uzavřeném systému. Před analýzou vzorku, v případě otevřeného systému, se zkumavka s biologickým materiálem nejprve mísí na valivé třepačce. Při práci s otevřeným systémem se do aspirační části analyzátoru vkládá každý vzorek zvlášť. Zkumavka je otevírána laborantkou. Při práci s uzavřeným systémem vkládáme zkumavky se vzorky do speciálních kazet, které poté vložíme do analyzátoru. Zde jsou vzorky samy míchány, aspirovány a analyzovány.

6.5.1 Vyšetření krevního obrazu

Vyšetření krevního obrazu patří mezi základní vyšetření a jeho význam je především v diagnostice a sledování průběhu léčby u různě nemocných pacientů. Jedná se o stanovení počtu buněk a jejich parametrů. Mezi měřené parametry patří:

- počet červených krvinek (RBC) – tento parametr vyjadřuje počet erytrocytů v jednom litru krve.

Za fyziologických podmínek jsou u novorozence tyto hodnoty vyšší než u dospělého člověka. Pohybují se v rozmezí $3,5 - 5,9 \times 10^{12} /l$.

V dospělosti jsou tyto hodnoty následující:

ženy $3,8 - 4,9 \times 10^{12} /l$

muži $4,3 - 5,7 \times 10^{12} /l$.

- počet bílých krvinek (WBC) – počet bílých krvinek v jednom litru krve.

Fyziologické hodnoty: novorozenci $20 - 30 \times 10^9 /l$

dospělí $4 - 9 \times 10^9 /l$.

- počet krevních destiček (PLT) – počet trombocytů v jednom litru krve
Fyziologické hodnoty: u novorozenců nacházíme počet trombocytů až dvojnásobně vyšší než u dospělého člověka.

Muži 130 – 380 x 10⁹ /l

Ženy 137 – 413 x 10⁹ /l

Mezi další parametry krevního obrazu patří:

- Hemoglobin (HGB) – koncentraci hemoglobinu stanovujeme pomocí absorpční spektrofotometrie.
- Hematokrit (HCT) – procentuální podíl objemu červených krvinek na celkovém objemu plné krve
Fyziologické hodnoty: muži 0,42 – 0,52
ženy 0,37 – 0,47
- Střední objem erytrocytu (MCV) – průměrný objem buňky v hodnocených erytrocytech.
- Střední množství hemoglobinu v erytrocytu (MCH)
- Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytární masě (MCHC)
- Šíře distribuce erytrocytů (RDW)
- Destičkový hematokrit (PCT)
- Střední objem trombocytu (MPV)
- Šíře distribuce destiček (PDW)

(Pecka, 2010, Kessler, 1992)

Klinické použití: Patologicky zvýšené hodnoty erytrocytů, hemoglobinu a hematokritu nacházíme např. u pravé polycytemie. Zvětšení erytrocytární masy a případné krvácení z gastrointestinálního traktu má za následek spotřebování zásob železa a postupně můžeme nalézat hypochromní mikrocyty. Dochází také ke zvýšení počtu leukocytů a především trombocytů. Snížené hodnoty nacházíme u vrozených či získaných anémií, které často doprovázejí různá onemocnění. Zvýšené počty trombocytů (trombocytózy) nacházíme nejčastěji po splenektomii a u myeloproliferativních chorob. Do této skupiny patří především polycytemie, primární trombocytémie a syndrom myelofibrózy.

(Friedmann, 1994)

6.5.2 Diferenciální rozpočet leukocytů

Diferenciální rozpočet leukocytů se provádí za účelem stanovení přesného zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů v periferní krvi. Toto vyšetření patří mezi základní vyšetření pro správné stanovení diagnózy. Změny v počtu jednotlivých typů leukocytů mohou značit různé chorobné stavy.

- GRANULOCYTÁRNÍ ŘADA

Během vývoje granulocytární řady rozlišujeme několik vývojových stádií. V pořadí: myeloblast – promyelocyt – myelocyt – metamyelocyt – nesegmentovaný granulocyt (tyč) – segmentovaný granulocyt. V průběhu tohoto vývoje dochází k postupnému zmenšování velikosti buněk, jádra a z původně bazofilní cytoplazmy se stává cytoplazma oxyfilní.

Rozeznáváme granulaci primární - azurofilní a sekundární – specifickou, která je trojího typu. Rozeznáváme proto neutrofilní, eozinofilní a basofilní segmenty.

- MONOCYTÁRNÍ ŘADA

První buňkou v této řadě je monoblast, morfologicky nerozlišitelná buňka od myeloblastu. Odlišit ji lze cytochemickým barvením. Dalším vývojovým stupněm je promonocyt a konečné stádium monocyt. Jedná se o největší buňku v periferní krvi, ve které je možné i za fyziologických podmínek pozorovat fagocytované částice. Charakteristická je také vakuolizace v cytoplazmě.

- LYMFOCYTÁRNÍ ŘADA

Prvním vývojovým stádiem v řadě lymfocytů je lymfoblast, dále pak prolymfocyt a konečné stádium tvoří lymfocyt. Rozlišujeme lymfocyt malý, který je v klidovém stádiu. Aktivovaný je lymfocyt velký.

Za fyziologických podmínek se v periferní krvi vyskytují tyče, segmenty – neutrofilní, eozinofilní a basofilní, lymfocyty a monocyty. (Lexová, 2000)

Tabulka 1: Rozpočet leukocytů v periferní krvi

	Dospělí (relativní počet)	Děti (relativní počet)
Tyče	0,00 – 0,05	0,00 – 0,06
Neutrofilní segmenty	0,40 – 0,70	0,25 – 0,60
Eozinofilní segmenty	0,00 – 0,04	0,01 – 0,05
Basofilní segmenty	0,00 – 0,01	0,00 – 0,01
Lymfocyty	0,25 – 0,45	0,25 – 0,50
Monocyty	0,00 – 0,07	0,01 – 0,06

Klinické použití: Vyšetření slouží ke stanovení nebo upřesnění mnoha diagnóz. Změny v počtech jednotlivých leukocytů bývají charakteristické pro určité onemocnění. V následujícím odstavci jsou pro demonstraci uvedeny některé změny v počtech leukocytů a jejich možné příčiny.

U infekčních a zánětlivých onemocnění je typická leukocytóza, čili zvýšený počet leukocytů. Snížený počet leukocytů - leukopenie je charakteristická pro dřeňové útlumy.

Zvýšený počet neutrofilů, tj. neutrofilie nacházíme např.: u myeloproliferativních stavů, akutních ztrát krve apod.

Naopak neutropenie, tj. snížený počet neutrofilů pozorujeme u poruch imunity a u všech typů závažných infekcí, např.: sepse. Eozinofile se vyskytuje nejčastěji při alergiích nebo při parazitárních onemocnění. Basofilie se vyskytuje také u alergií, u snížené činnosti štítné žlázy či u chronické myeloidní leukemie. Lymfocytóza je charakteristická pro akutní a chronické infekce a lymfopenii nacházíme např. po intoxikaci organismu. (Sakalová, 1995)

6.5.3 Stanovení retikulocytů

Retikulocyt je definován jako přechodná buňka mezi jaderným erytroblastem a zralým erytrocytem. Jedná se v podstatě o mladý erytrocyt, který dosahuje velikosti 7 – 9 μm a jeho objem je zhruba o 20% větší než objem plně vyžralého erytrocytu. V retikulocytech se nachází granula obsahující intravitálně barvitelné nukleové kyseliny (RNA). (Wintrobe, 1974)

Tato granula se nachází blíže středu buňky. Tímto se odlišují od Heinzových tělísek, která se nachází při okraji. (Pecka, 2002)

Klinické použití: Stanovení retikulocytů má význam především k posouzení erythropoetické aktivity kostní dřeně. Nedostatek retikulocytů, nebo jejich snížená tvorba svědčí o neúčinné erythropoéze, či útlumu krvetvorby. Naopak zvýšený počet retikulocytů může znamenat krvácení nebo hemolýzu. Toto vyšetření také poukazuje na průběh léčby erythropoetinem, případně nás informuje o úspěšné transplantaci kostní dřeně. (Pecka, 2010)

6.6 Vyšetření prováděná na analyzátoru Abbott Axsym

Na tomto analyzátoru se v současné době provádí pouze stanovení D-dimerů. Jedná se o enzymovou imunoanalýzu na mikročásticích (MEIA - Micro-particle Enzyme Immunoassay) ke kvantitativnímu stanovení D-dimeru v plazmě.

6.6.1 Stanovení D- dimerů

Proces vedoucí k degradaci fibrinu se nazývá fibrinolýza. Produkty štěpení fibrinogenu a rozpustného fibrinu se nazývají fibrin (fibrinogen) degradační produkty (FDP). Štěpení nerozpustného fibrinu plazminem však vede k zisku tzv. D-dimerů. Jsou to vlastně dvě D domény spojené kovalentní vazbou, která není plazminem štěpitelná. D-dimer představuje specifický marker trombofilních stavů. (Matýšková, 1999)

Klinické použití: Zvýšenou hladinu D-dimerů nacházíme při zánětlivých komplikacích, poraněních, u plicní embolie nebo např. u hepatopatií. Fyziologicky je hladina zvýšena v době menstruace a při těhotenství. (Pecka, 2010)

7 PRAKTICKÁ ČÁST

7.1 Postup pro verifikaci metody a vypracování verifikačního protokolu

1. Vybrali jsme si metodu pro verifikaci.
2. V průběhu denních směn byly mezi vzorky pacientů zařazovány kontrolní vzorky používané v rámci vnitřní kontroly kvality. Pro vybranou metodu jsme tedy tímto způsobem za určité časové období získali minimálně 20 naměřených hodnot.
3. Kontrolní vzorky jsme proměřovali alespoň na dvou klinicky a laboratorně významných hladinách. Před vlastním měřením jsme vzorek nechali 10 minut promíchat na valivé třepačce.
4. Z množství naměřených hodnot jsme vypočítali průměr, směrodatnou odchylku (SD) a variační koeficient (CV).
5. Takto získaná data jsme následně dosadili jako hodnotu mezilehlé přesnosti do verifikačního protokolu, který jsme vypracovali ve speciálním programu SLP. Do protokolu jsme dále uvedli časové období od kdy, do kdy byla data sbírána a název kontrolního materiálu, který jsme použili.
6. Vybrali jsme vhodný materiál pro měření opakovatelnosti.
7. Před vlastním měřením jsme nechali vzorek 10 minut promíchat na valivé třepačce. Materiál jsme poté proměřovali minimálně na dvou hladinách v sérii 10x po sobě za stejných podmínek.
8. Naměřené hodnoty jsme zapsali do verifikačního protokolu spolu s přesným názvem použitého materiálu.
9. Program SLP nám automaticky vypočítal průměr, SD a CV. Zadali jsme cílovou hodnotu, která je uváděna výrobcem u kontrolního materiálu.
10. Do verifikačního protokolu jsme také zadali hodnoty intraindividuální biologické variability (CV_i) a interindividuální (CV_g) biologické variability. Tyto hodnoty jsou dostupné na webu. (web4)
11. Po zadání hodnot CV_i a CV_g nám program SLP automaticky vypočítal celkovou biologickou variabilitu, přesnost odvozenou z biologických variabilit (I_{biol}), bias odvozený z biologických variabilit (B_{biol}) a celkovou chybu odvozenou z biologických variabilit (TE_{biol}).

12. Součást verifikačního protokolu je také kombinovaná nejistota. Výpočet této hodnoty provedl program SLP také automaticky.

7.2 Verifikační protokol ze dne 10.12.2010 – Hemoglobin

Metoda: HGB

Název soupravy: HMX

Analyzátor: Coulter HMX

Výrobce: Coulter

Vyhodnotil: Knoppová Kateřina

Datum : 10.12.2010

1. Mezilehlá přesnost

	Datum (od – do)	Použitý materiál	Počet hodnot	Průměr	SD	CV
Vzorek 1	1.10.2010-31.10.2010	Coulter 5C cell control	31	163,00	1,880	1,158
Vzorek 2	15.3.2011-14.4.2011	Coulter 5C cell control abnormal I	20	128,00	1,500	1,200
Vzorek 3	15.3.2011-14.4.2011	Coulter 5C cell control abnormal II	19	4,900	0,500	1,400

2. Opakovatelnost, bias

Provedl: Knoppová Kateřina

Datum: 25.3.2011

Použitý materiál: Vzorek A = Coulter 5C cell control Normal

Vzorek B = Coulter 5C cell control Abnormal I

Vzorek C = Coulter 5C cell control Abnormal II

Intraindividuální biologická variabilita (CV_i) = 2,8

Interindividuální biologická variabilita (CV_g) = 6,6

Celková biologická variabilita = 7,1

Přesnost odvozená z biologických variabilit (I_{biol}) = 1,4

Bias odvozený z biologických variabilit (B_{biol}) = 1,7

Celková chyba odvozená z biologických variabilit (TE_{biol}) = 4,1

Výsledné hodnoty

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorek A	160,0	159,0	161,0	160,0	159,0	161,0	159,0	161,0	161,0	161,0
Vzorek B	130,0	130,0	130,0	130,0	131,0	130,0	130,0	130,0	129,0	130,0
Vzorek C	49,0	49,0	49,0	49,0	49,0	49,0	49,0	49,0	49,0	49,0

Vyhodnocení

	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Jednotky
Průměr	160,200	130,000	49,000	g/l
Cílová hodnota	161,000	129,000	49,000	g/l
Nejistota ref. Materiálu				%
SD	0,918	0,471		
CV	0,573	0,362		%
R(x)	99,503	100,775	100,00	%
B	-0,496	0,775		%

Cílová hodnota nejistoty (%) : 3,000

Výsledek verifikace: (*) Vzorek A vyhovuje

(*) Vzorek B vyhovuje

(*) Vzorek C vyhovuje

3. kombinovaná nejistota

	$U_{r,tot}$ (%)	Pro cílovou hodnotu	Výsledek měření se pohybuje v tomto intervalu (při 95% intervalu spolehlivosti)	Kritická diference dvou následných měření (hodnota CD%)
Vzorek A	1,273	161,000	156,900 – 165,099	6,6
Vzorek B	1,433	129,000	125,302 – 132,697	7,9
Vzorek C	1,400	49,000	47,628 – 50,372	8,7

Závěr

Verifikace proběhla úspěšně a splňuje veškeré podmínky pro použitelnost v klinické praxi. Je třeba zjistit nejistotu referenčního materiálu – jednání s výrobcem. Platnost do 1.4.2012

7.3 Verifikační protokol ze dne 15.11.2010 – Protrombinový test

Metoda: PT

Název soupravy: Actin FS

Analyzátor: Sysmex CA 500

Výrobce: Dade

Vyhodnotil: Knoppová Kateřina

Datum : 15.11.2010

1. Mezilehlá přesnost

	Datum (od – do)	Použitý materiál	Počet hodnot	Průměr	SD	CV
Vzorek 1	17.9.2010- 14.11.2010	COAG- NORM	30	12,143	0,265	2,209
Vzorek 2	18.9.2010- 15.11.2010	COAG- PATH	30	23,977	1,677	6,974

2. Opakovatelnost, bias

Provedl: Knoppová Kateřina

Datum: 11.3.2011

Použitý materiál: Vzorek A = COAG - NORM

Vzorek B = COAG - PATH

Intraindividuální biologická variabilita (CV_i) = 4,0

Interindividuální biologická variabilita (CV_g) = 6,8

Celková biologická variabilita = 7,8

Přesnost odvozená z biologických variabilit (I_{biol}) = 2,0

Bias odvozený z biologických variabilit (B_{biol}) = 1,9

Celková chyba odvozená z biologických variabilit (TE_{biol}) = 5,2

Výsledné hodnoty

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorek A	11,00	10,8	10,9	10,7	11,1	11,0	11,0	11,0	10,8	10,7
Vzorek B	15,6	15,5	16,2	16,1	15,4	16,3	16,6	15,7	16,2	16,7

Vyhodnocení

	Vzorek A	Vzorek B	Jednotky
Průměr	10,900	16,030	s
Cílová hodnota	11,000	16,000	s
Nejistota ref. Materiálu			%
SD	0,141	0,457	
CV	1,297	2,851	%
R(x)	99,090	100,187	%
B	-0,909	0,187	%

Cílová hodnota nejistoty (%) : 10,000

Výsledek verifikace: (*) Vzorek A vyhovuje

(*) Vzorek B vyhovuje

3. kombinovaná nejistota

	$U_{r,tot}$ (%)	Pro cílovou hodnotu	Výsledek měření se pohybuje v tomto intervalu (při 95% intervalu spolehlivosti)	Kritická diference dvou následných měření (hodnota CD%)
Vzorek A	2,423	11,000	10,466 – 11,533	9,7
Vzorek B	7,034	16,000	13,748 – 18,251	18,9

Závěr

Verifikace proběhla úspěšně a splňuje veškeré podmínky pro použitelnost v klinické praxi. Je třeba zjistit nejistotu referenčního materiálu – jednání s výrobcem. Platnost do 1.4.2012

8 DISKUSE

Dnešní doba klade vysoké nároky na správnost a přesnost laboratorních výsledků, proto je nutné, aby laboratoře používaly validované metody a vedly řádně řízenou dokumentaci, která je nutná pro akreditaci.

V rámci validace je nezbytné verifikovat používané metody. Verifikace metod se v OKBH Panochovy nemocnice s.r.o. Turnov provádí pravidelně jednou ročně. Tímto procesem v podstatě ověřujeme, zda je metoda použitelná pro klinickou praxi a splňuje veškeré podmínky deklarované výrobcem.

Oba uvedené verifikační protokoly splňují všechny požadavky a tyto metody mohou být používány pro klinickou činnost. V případě, že verifikace nevyjde, je potřeba měření zopakovat s jiným referenčním materiálem, případně prozkoumat další možnosti zdroje chyb.

Nutností laboratoře je také provádět pravidelně vnitřní a vnější kontrolu kvality. Tyto procesy nám umožňují včas odhalit případnou chybu a také fungují jako zpětná vazba pro laboranty a dokazují tak, že naměřené výsledky jsou spolehlivé.

9 ZÁVĚR

Zabývali jsme se nejfrekventovanějšími metodami pro hematologický úsek OKBH Panochovy nemocnice s.r.o. Turnov. Do teoretické části jsme zařadili krátké představení laboratoře a proces akreditace, na který se laboratoř připravuje a díky kterému v podstatě tato bakalářská práce vznikla. Dále pak jednotlivé analyzátory a vyšetření, která se na nich provádí a jejich význam. U vyšetření APTT a PT jsou uvedeny standardní operační postupy. Pro vypracování verifikačních protokolů jsme průběžně proměřovali kontrolní vzorky na vybraných analyzátořech a na základě naměřených hodnot jsme pracovali na těchto protokolech. Verifikační protokoly jsou zařazeny do praktické části. Verifikace obou metod byla úspěšná a tyto metody mohou být tedy používány pro klinickou praxi.

Práce mi byla velikým přínosem, především v oblasti laboratorní dokumentace, která je v dnešní době velice důležitou součástí správně fungující laboratoře. Díky této bakalářské práci jsem se naučila pracovat s programem SLP, který jsme využívali pro přípravu SOP, verifikačních protokolů, ale také při přípravě laboratorní příručky.

10 LITERATURA

FRIEDMANN B., Hematologie v praxi, 1. vydání Galén, Praha, 1994, str. 155 - 157, ISBN 80-85824-05-1

KESSLER S., Laboratorní diagnostika, 1. vydání, Weinheim: Ed Meditin, VCH, 1992, str. 230–231, ISBN 80–85526–12-3

KOPÁČ J.: Lékařská laboratorní diagnostika, 1.vyd. Turnov 2004, str. 67, 550

LEXOVÁ S., Hematologie pro zdravotní laboranty, IDVPZ Brno, 2000, str.,19-21 ISBN 80-7013-304-X

MATÝŠKOVÁ M., ZAVŘELOVÁ J., HRACHOVINOVÁ I.,:Hematologie pro zdravotní laboranty 2. díl Krevní srážení, 1.vyd.IDVPZ Brno, 1999, str. 48, 123 ISBN 80–7013–278-7

PECKA M., BLÁHA M., FÁTOROVÁ I. a kol.: Praktická hematologie – laboratorní metody, 1.vyd.Český Těšín, 2010, str. 209 – 212, 79 – 81, 125, 233 ISBN 978-80-903871-9-5

PECKA M., Laboratorní hematologie v přehledu – Fyziologie a patologie hemostázy, 1.vyd.Český Těšín, 2004, str. 48, ISBN 80-86682-03-X

PECKA M., Laboratorní hematologie v přehledu – Buňka a krvinek, Český Těšín, 2002, str. 99, ISBN 80-86682-01-3

RACEK J. a kol., Klinická biochemie, 2. vydání Galén, Praha, 2006, str.56-57 ISBN 80-7262-324-9

SAKALOVÁ A., LIPŠIC T. a kol., Hematologia a transfuzologia. Teoria a cvičenia. Martin, Osveta, 1995, str. 77–80, ISBN 80-217-0444-6

WINTROBE M., LEE G. R.,BOGGS D., et al.: Clinical Hematology, 7. vydání, Lea& Febiger, Philadelphia, 1974, str. 83 – 84, ISBN 0-8121-0414-5

Web 1 FRIEDECKÝ B., KRATOCHVÍLA J., KUBÍČEK Z., <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/BFAHL.php>, 10.3. 2011

Web 2 BOURKOVÁ L., MATÝŠKOVÁ M., KRATOCHVÍLA J., http://www.sekk.cz/Texty/2010_KO_VKK.pdf, 7.3. 2011

Web 3 KASAL E., <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/antitrombin-indikace-a-vyuziti-v-praxi-455573>, 21.3.2011

Web 4 <http://www.westgard.com/biodatabase-2010-update.htm>, 25.3.2011

Web 5 http://www.sekk.cz/slp/SLP_popis.htm, 15.3.2011

OBRAZOVÁ PŘÍLOHA



Obr.1 Beckman Coulter HmX



Obr. 2 Sysmex CA 500



Obr. 3 Centrifugy Haeraeus